



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **55432** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
C05F 11/00  
C12N 1/20

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ SINORRHIZOBIUM MELILOTI T17 (IMB B-7282) ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ БАКТЕРІАЛЬНОГО ДОБРИВА ПІД ЛЮЦЕРНУ**

1

(21) u201007843  
(22) 23.06.2010  
(24) 10.12.2010  
(46) 10.12.2010, Бюл. № 23, 2010 р.  
(72) КОЦЬ СЕРГІЙ ЯРОСЛАВОВИЧ, ВОРОБЕЙ  
НАДІЯ АНАТОЛІЙВНА, МАЛІЧЕНКО СВІТЛАНА  
МАРКІВНА, БУТНИЦЬКИЙ ІВАН МИКОЛАЙОВИЧ

2

(73) ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ РОСЛИН І ГЕНЕТИКИ  
НАН УКРАЇНИ  
(57) Штам бактерій Sinorhizobium meliloti T17 (IMB  
B-7282) для одержання бактеріального добрива  
під люцерну.

Корисна модель відноситься до мікробіологічних заходів підвищення урожайності бобових культур і може бути використаний у виробництві бактеріального добрива під люцерну.

Впровадження у сільськогосподарське виробництво нових сортів люцерни, розширення їх посівів у регіонах, а також зниження з плином часу у деяких штамів бульбочкових бактерій люцерни активності зумовлює необхідність отримання нових високоефективних, конкурентоздатних штамів Sinorhizobium meliloti. Нові штами бульбочкових бактерій виділені із природних біоценозів (аналітична селекція) нерідко поступаються за азотфіксувальною активністю і ефективністю виробничим штамам Rhizobium. Використання методів молекулярної генетики і генної інженерії, зокрема, транспозонового мутагенезу дозволяє значно розширити спектр спадкової мінливості ризобій і дає можливість отримати нові форми бульбочкових бактерій із покращеними господарсько-цінними ознаками. При цьому вихідними (батьківськими) штамами можуть слугувати музейні та виробничі культури Sinorhizobium аналітичної селекції, які пристосовані до лабораторних умов зберігання і є конкурентоздатними в умовах довкілля.

Протягом багатьох років в Україні для виробництва бактеріальних добрив під люцерну використовується штам S. meliloti 425a, отриманий методом аналітичної селекції [А. с. СРСР №549454, C05F 11/08, 25.05.77]. Впродовж останніх років методом гібридизації отримані конкурентоспроможні ефективні у симбіозі із люцерною сорту Ярославна штами S. meliloti: M4 [патент України №13298, C05 F 11/08, C 12 N1/20, 28.02.97.] і M12 [патент України №50851 C05 F 11/08, C 12 N1/20,

15.11. 2002]. Зокрема використання для інокуляції штаму M12 забезпечує надбавку урожаю зеленої маси люцерни від 24 до 36ц/га (8,1-14,5%), а насіння від 0,20 до 0,21ц/га (15,4-22,7%) порівняно із виробничим штамом 425a S. meliloti залежно від ґрунтово-кліматичних умов вирощування згаданої культури.

Задачею корисної моделі є одержання штаму бульбочкових бактерій люцерни з високою азотфіксувальною активністю і вірулентністю, який би дозволяв підсилити процес симбіотичної азотфіксації у декількох районованих сортів люцерни, підвищити їх продуктивність і покращити якість надземної маси.

Спосіб отримання штаму. Штам бактерій Sinorhizobium meliloti T17 одержано в результаті транспозонового мутагенезу тобто міжродової кон'югації Escherichia coli S17-1 (pSUP2021::Tn5) і Sinorhizobium meliloti 425a на агаризованому середовищі і подальшої багатоступеневої селекції за симбіотичними властивостями в умовах симбіозу з рослинами різних сортів люцерни.

Штам ідентифіковано за визначником Бергі [Краткий определитель Берги. - М.: Мир, 1980. - 495 с.] і депоновано у Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України під реєстраційним номером IMB B-7282.

Основні культурально-морфологічні ознаки запропонованого штаму. Штам T17 Sinorhizobium meliloti це дрібні грамнегативні палички розміром 0,6-0,7×1,3-1,6мкм, у молодому віці рухливі, при старінні втрачають рухливість, мають перитрихіяльні джгутики, утворюють бактероїди. Культура швидко росла, не спороносна. Бактерії пігмент не

(19) **UA** (11) **55432** (13) **U**

продукують. Колонії помірно-випуклі, слизисті, з часом розростаються і можуть розтікатись по поверхні агаризованого середовища. Запропонований штам є мікроаерофілом. Температурний діапазон його росту становить 25-28°C. Діапазон pH - 6,5-7,4.

Генетичні особливості: прототроф, стійкий до антибіотиків. У геномі клітин штаму T17 *S. meliloti*, присутній фрагмент транспозону Tn5 довжиною 517 н. п. (результати аналізу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР аналіз) ДНК), що відрізняє його від вихідного (батьківського) штаму 425a *S. meliloti* і забезпечує стійкість до сульфату канаміцину в концентрації 200 мг/мл.

Штам непатогенний, нетоксичний.

Фізіолого-біохімічні ознаки. Культура бульбочкових бактерій *Sinorhizobium meliloti* 17 відновлює нітрати і нітрити, використовує гідролізат лактальбуміну, має каталазну та уреазну активність, засвоює сечовину та амонійні солі, амінокислоти, гідролізує казеїн. Культура не розріднює желатину, не використовує клітковину, не утворює сірководень ( $H_2S$ ), слабо пептонізує молоко. Росте на середовищах із вуглеводами. Активно засвоює арабінозу, глюкозу, мальтозу, галактозу, мелібіозу, фруктозу, D-фукозу, L-фукозу, L-ксилозу із утворенням кислих продуктів. Слабо засвоює ксилозу, рафінозу і сорбіт. Полісахариди - крохмаль, глікоген не гідролізує. Із багатоатомних спиртів засвоює маніт. Відмінним джерелом вуглецю для досліджуваного штаму є меляса.

Запропонований штам бульбочкових бактерій *S. meliloti* T17 добре культивується на середовищах наступного складу:

Синтетичне середовище N79 (г/л:  $K_2HPO_4$  - 0,5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,2, NaCl - 0,1,  $CaCO_3$  - сліди, казамінокислоти (або гідролізат лактоальбуміну) - 0,1% (1г), маніт - 10,0, агар - 17,0, дист. вода - 1 літр). Стерилізувати при 0,75 атм 40хв, pH 6,8-7,2.

Бобовий агар (г/л: горох - 100, сахароза - 20,0, NaCl - 1,0, агар - 15-18. В 1л води кип'ятити 100г гороху 30хв, настояти 20хв. Відвар відцідити, розчинити добавки. Стерилізувати при 1 атм 30хв, pH 6,8-7,2.

Манітно-дріжджовий агар (МДА) (г/л:  $K_2HPO_4$  - 0,5,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,2, NaCl - 0,1, маніт - 10,0, дріжджовий екстракт - 1,0, агар - 15,0-17, 0, дист. вода, pH - 7,0. Стерилізувати при 1 атм 30хв, pH 6,8-7,2.

Має слабкий ріст на картопляному агарі. На МПА бактерії ростуть. Штрих слабкий, утворює менше слизу порівняно з ростом на інших середовищах.

Азотфіксувальну активність штаму, що пропонується, визначали в мікровегетаційних, вегетаційних і польових дослідках за редукцією ацетилену в етилен за методом Харді із співавт. [Hardy R.W.F., Holsten R.D., Jackson E.K., Bums R.C. 1968] на газовому хроматографі Agilent Technologies 6850 Network GC System із полум'яно-іонізаційним детектором.

Ефективність штаму T17 *S. meliloti* перевіряли на люцерні сортів Ярославна Ольга, Зірниця, Зайкевича в умовах мікровегетаційних (перліт, середовище Красильникова-Кореняко), вегетаційних (промийтий річковий пісок, збагачений сумішшю Гельрігеля і азотом  $Ca(NO_3)_2$  0,25 норми) і польових дослідів (на чорноземі опідзоленому, середньосуглинковому, вміст гумусу 3,0%, N - 11,4,  $P_2O_5$  - 10,4,  $K_2O$  - 8,1 мг/100г ґрунту) у зоні Західного лісостепу України (Тернопільська обл.), а також на сірому опідзоленому лісовому, супіщаному ґрунті (pH 5,9-6,0), вміст гумусу 1,2-1,5%, фосфору 8,8-10,1, калію 9,4-10,2, азоту 10,4-12,6 мг/100г ґрунту) Київської області.

Передпосівну інокуляцію насіння проводили бактеріальною суспензією із титром  $10^9$  клітин/мл. Для її отримання штам T17 вирощували на манітно-дріжджовому агарі при 28°C протягом 4 діб у пробірках. Культуру із поверхні агару змивали стерильною водою, готували густу суспензію (50мл), якою засівали качалочні колби із 350мл середовища. Культивування проводили протягом 3-4 днів при +27°C із використанням стаціонарної качалки, яка забезпечувала постійну аерацію середовища вирощування.

Для виготовлення препарату на твердому носії у пакети із перлітом (вермикулітом) (130г/га) вводили стерильно 50мл суспензії бульбочкових бактерій штаму T17 і поживні добавки (мелясу, кукурдзяний екстракт, глюкозу), добре перемішували. Приготовлене таким чином бактеріальне добриво витримували при 18-20°C 5-10 діб. Після термостатування перевіряли титр бактерій (в 1г бактеріального препарату на твердому носії повинно бути не менше 1,0-1,5 млрд. клітин *Sinorhizobium meliloti*) і проводили інокуляцію насіння. Для цього гектарну норму насіння зволожували (1-2% води від маси насіння), рівномірно перемішували із бактеріальним препаратом, підсушували в тіні та висівали в ґрунт.

Інший спосіб передбачає обробку насіння люцерни водною витяжкою із бактеріального препарату на твердому носії. Для цього 250г препарату розмішували у воді і фільтрували через марлю (грубі частинки перліту таким чином відділяли від основної суспензії). Отриману суспензією інокулювали гектарну норму насіння.

Посів люцерни проводили у другій декаді квітня з шириною міжрядь 45см і глибиною загортання насіння 1,5-2,0см. Передпосівну обробку проводили за 1 годину до висіву насіння в ґрунт бактеріальною суспензією або препаратом на твердому носії. Насіння висівали із розрахунку 15кг/га.

Дослідження проведені в умовах вегетаційного та польового дослідів показали, що бактерії рекомендованого штаму утворюють більшу кількість і масу бульбочок на коренях рослини-господаря (табл. 1) та інтенсивніше асимілюють атмосферний азот порівняно із штамми M12 та стандартом 425a (табл. 2, 3).

Таблиця 1

Динаміка кількості та маси кореневих бульбочок люцерни сорту Ярославна, інокульованої бульбочковими бактеріями *S. meliloti* (польові досліді, Київська обл., 2005-2006 рр.).

Варіант	Кількість бульбочок, шт./рослину			
	Стеблування	Бутонізація	Початок цвітіння	Цвітіння
425а (виробничий)	5,5±0,6	11,4±1,9	14,5±1,5	6,0±0,4
M12	6,7±1,0	12,2±2,6	19,0±1,0	13,0±0,7
T17 (запропонований)	8,0±0,9	19,8±1,7	21,0±1,5	21,4±1,0
Маса бульбочок, мг				
425а (виробничий)	9,5±0,3	25,0±1,7	37,6±9,7	45,0±4,0
M12	13,6±0,5	57,6±7,5	60,6±9,7	55,0±10,0
T17 (запропонований)	17,9±1,2	67,2±4,1	70,0±7,5	63,0±5,7

Симбіоз люцерни із штамом T17 *S.meliloti* характеризується тривалим періодом активної фіксації азоту кореневими бульбочками у т. ч. і у фазу формування генеративних органів порівняно із рослинами, які фіксують азот у симбіозі із штамми 425а або M12 (табл. 3).

Ефективність інокуляції люцерни запропонованим штамом перевіряли використовуючи для інокуляції рідке добриво і добриво на твердому сипучому носії (вермикуліт). Інокуляція люцерни рідким препаратом виготовленим на основі штаму T17 забезпечує прибавку урожаю надземної маси люцерни сорту Ярославна 15,5% (48,2ц/га) (табл. 4), сорту Ольга - 13,1% (39,4ц/га) (табл. 5), сорту Зірниця - 9,6% (16,9ц/га) (табл. 6) порівняно із інокуляцією вказаних сортів виробничим штамом 425а.

При використанні сипучого препарату (виготовлений на твердому носії - вермикуліт) на люцерні сорту Зірниця прибавка урожаю зеленої маси люцерни становила 12,6% (22,1ц/га) порівняно із виробничим штамом 425а (табл. 4) і 26,1% (40,9ц/га) порівняно із варіантом без інокуляції.

У результаті утворення ефективного симбіозу із люцерною посилюється розвиток рослин та підвищується урожай зеленої маси при одночасному

покращенні його якості за рахунок збільшення вмісту в ньому білка. Внаслідок інокуляції люцерни посівної запропонованим штамом T17, вміст загального азоту у надземній масі рослин люцерни збільшився відповідно на 0,3 і 0,4%, а протеїну на 1,6 і 2,4абс. % (табл. 7) порівняно із бактеризацією рослин базовим M12 і виробничим штамом 425а *S. meliloti*.

В умовах вегетаційних і польових дослідів, інокуляція люцерни запропонованим штамом T17 призводила до збільшення вмісту хлорофілів у листках рослин порівняно із штамми M12 і 425а (табл. 7).

Додатковою перевагою штаму T17 є його висока конкурентоздатність, яка забезпечує йому пріоритет у процесі утворення бульбочок при вирощуванні люцерни за присутності сторонньої ризобіальної мікрофлори. Конкурентоздатність штаму T17 визначали непрямим методом (за надземною масою інокульованих рослин) і розраховували за формулою Амаргер (Amarger N., 1981). На люцерні сорту Ярославна запропонований штам T17 проявляв конкурентоздатність на рівні еталонного виробничого штаму 425а *S. meliloti* (табл. 9).

Таблиця 2

Динаміка азотфіксувальної активності люцерни сорту Ярославна у вегетаційному досліді.

Варіант	Азотфіксувальна активність, мкмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /(рослину·год)		
	Фаза розвитку рослин, доба після сходів		
	Стеблування, 30-а	Бутонізація, 38-а	Початок цвітіння, 57-а
425а (виробничий)	0,26±0,023	0,80±0,08	2,01±0,04
T17 (запропонований)	0,37±0,43	0,94±0,03	5,10±0,14

Таблиця 3

Динаміка азотфіксувальної активності люцерни сорту Ярославна у польовому досліді (2005 р. Київська обл.)

Варіант	Азотфіксувальна активність, (мкмоль C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /(рослину·год)				
	Перший рік вегетації				
	Стеблування	Бутонізація	Початок цвітіння	Цвітіння	Утворення бобів
425а (виробничий)	0,11±0,01	1,56±0,19	0,87±0,11	0,60±0,05	0,40±0,03
M12 (базовий)	0,60±0,05	3,06±0,31	0,74±0,08	0,74±0,09	0,43±0,03

Продовження таблиці 3

Варіант	Азотфіксувальна активність, (мкмоль $C_2H_4$ /(рослину·год)				
	Перший рік вегетації				
	Стеблуння	Бутонізація	Початок цвітіння	Цвітіння	Утворення бобів
T17 (запропонований)	0,25±0,05	5,38±0,13	1,96±0,30	1,49±0,12	1,55±0,07

Таблиця 4

Урожай зеленої маси люцерни сорту Ярославна,  
інокульованої бульбочковими бактеріями *S. meliloti* (польовий дослід, 2005-2006 рр., Київська обл.).

Варіант	Урожай зеленої маси, ц/га				
	2005 р. 1-й рік вегетації	2006 р. 2-й рік вегетації	Середній за 2 роки	Прибавка до штаму 425а	
425а (виробничий)	308,0±8,7	314,3±8,2	311,2	-	-
M12	339,4±11,2	347,7±13,4	343,6	32,4	10,4
T17 (запропонований)	352,3±7,6	366,5±8,4	359,4	48,2	15,5
HIP <sub>0,05</sub>	28,2	47,2			

Таблиця 5

Урожай зеленої маси і азотфіксувальна активність люцерни  
сорту Ольга у польових дослідах, 2005-2006 рр., (Тернопільська обл.)

Варіант	Азотфіксувальна активність (мкмоль $C_2H_4$ /(рослину·год))		Урожай зеленої маси, ц/га						
	1-й рік вегетації, 2005 р.	2-й рік вегетації, 2006 р.	1-й рік вегетації, 2005 р.	2-й рік вегетації, 2006 р.	Середній за 2 роки	Прибавка зеленої маси			
						до контролю		до штаму 425 а	
						ц/га	%	ц/га	%
Контроль (без інок.)	0,60±0,03	0,38±0,03	309,8±5,2	250,9±11,1	280,3	-	-	-20,1	-6,7
425а (виробничий)	1,46±0,12	0,71±0,06	310,2±6,2	290,7±9,1	300,4	20,1	7,2	-	-
T17 (запропонований)	1,96±0,08	1,28±0,1	345,6±5,2	333,9±20,2	339,8	59,5	21,2	39,4	13,1
HIP <sub>0,05</sub>			19,8	12,5					

Таблиця 6

Урожай зеленої маси та азотфіксувальна активність (мкмоль  $C_2H_4$ /(рослину год)  
люцерни сорту Зірниця у польових дослідах (2007-2008 рр., Тернопільська обл.).

Варіант	Азотфіксувальна активність		Урожай зеленої маси, ц/га						
	1-й рік вегетації, 2007 р.	2-й рік вегетації, 2008 р.	1-й рік вегетації, 2007 р.	2-й рік вегетації, 2008р.	Середній за 2 роки	Прибавка зеленої маси			
						до контролю		до штаму 425а	
						ц/га	%	ц/га	%
Контроль (без інокуляції)	0,22±0,02	0,04±0,05	101,0±8,3	212,4±4,6	156,7	-	-	-18,8	-10,8
425а (виробничий)	0,45±0,06	0,16±0,02	126,0±6,1	225,0±9,7	175,5	18,8	12,0	-	-
T17 (запропонований) (рідка форма препарату)	0,91±0,08	0,26±0,03	134,0±2,8	250,8±9,2	192,4	35,7	22,8	16,9	9,6
T17 (запропонований) (препарат на твердому носії)	1,38±0,12	0,38±0,05	136,8±8,3	258,4±8,2	197,6	40,9	26,1	22,1	12,6

Таблиця 7

Вміст азоту і протеїну у люцерни сорту Ярославна, інокульованої бульбочковими бактеріями *S. meliloti* (вегетаційний дослід, фаза - початок цвітіння).

Варіант	Зелена маса	Суха маса	Вміст у повітряно-сухій речовині	
	г/посудину		азоту, %	протеїну, %
425а (виробничий)	34,86±1,05	10,07±0,34	2,8±0,0	17,3
M12	33,20±0,90	10,59±0,36	2,9±0,1	18,1
T17 (запропонований)	35,33±2,14	12,20±0,63	3,2±0,0	19,7

Таблиця 8

Вплив інокуляції штамом T17 *S. meliloti* на вміст фотосинтетичних пігментів (мг/г маси сирової речовини) в листках рослин люцерни (фаза - бутонізація).

Штам	Хлорофіл а	Хлорофіл b	Сума хлорофілів	Каротиноїди
сорт Ярославна (вегетаційний дослід,)				
Без інокуляції	0,87±0,06	0,55±0,04	1,42	0,18±0,01
425 а (виробничий)	1,78±0,01	0,64±0,03	2,42	0,29±0,02
T17 (запропонований)	2,47±0,15	0,83±0,05*	3,30	0,39±0,02
сорт Ярославна (польовий дослід, Київська обл.)				
425а (виробничий)	1,18±0,06	0,37±0,02	1,55	0,17±0,01
M12 (базовий)	1,20±0,04	0,33±0,03	1,53	0,22±0,01
T1 7 (запропонований)	1,38±0,01	0,33±0,01	1,71	0,26±0,02
сорт Зірниця (польовий дослід, Тернопільська обл.)				
Без інокуляції	1,23±0,006	0,69±0,001	1,92	0,51±0,01
425а (виробничий)	1,27±0,01	0,72±0,001	1,99	0,68±0,02
T17 (запропонований)	1,40±0,06	0,86±0,005	2,27	0,53±0,01

Таблиця 9

Ефективність азотфіксації і конкурентоздатність нового штамів бульбочкових бактерій люцерни T17 у вегетаційному досліді.

Варіант	Абсолютно суха речовина, г/посудину		Конкурентоздатність, %
	інокуляція активним штамом (шт. +)	інокуляція сумішшю (шт. + + шт. -)	
Без інокуляції	1,54±0,02		
CXM1-48 (неактивний)	1,37±0,07		
425а (виробничий)	1,65±0,09	1,59±0,06	78,0
T17 (запропонований)	2,24±0,02	2,07±0,06	80,0

Рекомендований штам T17 *S. meliloti* достатньо технологічний і його можна використовуватися у виробництві бактеріального добрива під люцерну, оскільки добре приживається і інтенсивно розмножується на сипучих субстратах-носіях - вермикуліті й перліті, збагачених поживними домішками (кукурудзяний екстракт, меляса, глюкоза). Протягом 45 діб зберігання бактеріальний титр препаратів виготовлених на основі штамів T17 мав тенденцію до збільшення порівняно із препаративними формами на основі штамів 425а і M12.

Отже, запропонований штам T17 *Sinorhizobium meliloti* відрізняється від виробничого штамів 425а за фізіолого-біохімічними і генетичними ознаками, утворює високоефективний симбіоз із низкою сортів люцерни у різних ґрунтово-

кліматичних умовах. Використання запропонованого штамів T17 для бактеризації ряду районованих сортів люцерни у різних ґрунтово-кліматичних умовах збільшує урожай зеленої маси в середньому на 15,1-22,8% (31,7-42,5ц/га) порівняно із варіантом без інокуляції і на 9,6-15,5% (16,9-48,2ц/га) порівняно із виробничим штамом 425а *S. meliloti*.

Таким чином, запропонований штам T17 *Sinorhizobium meliloti* за основними господарсько-корисними властивостями - ефективністю симбіозу, накопиченням азоту та протеїну у надземній масі рослини-господаря, конкурентоздатністю та технологічністю переважає штамів 425а і M12 та рекомендується для виготовлення бактеріальних добрив під люцерну.

